

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

14. 9. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 3 年 9 月 8 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 3 1 5 7 9 9
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 1 5 7 9 9]

出 願 人
Applicant(s): 東洋紡績株式会社

REC'D 04 NOV 2004

WIPO

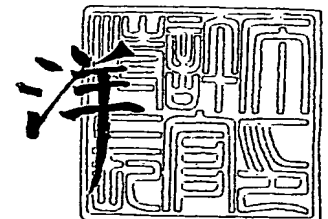
POT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 0 月 2 1 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 9 4 8 6 1

【書類名】 特許願
【整理番号】 CN03-0612
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
【発明者】
 【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 1 0 番 2 4 号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ
 研究所内
 【氏名】 松村 肇庸
【発明者】
 【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 1 0 番 2 4 号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ
 研究所内
 【氏名】 竹嶋 誠嗣
【発明者】
 【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 1 0 番 2 4 号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ
 研究所内
 【氏名】 岸本 高英
【発明者】
 【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 1 0 番 2 4 号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ
 研究所内
 【氏名】 岡 正則
【特許出願人】
 【識別番号】 000003160
 【氏名又は名称】 東洋紡績株式会社
 【代表者】 津村 準二
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 000619
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

野生型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸を欠失、置換もしくは付加することにより、野生型と比較して、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において、比活性を向上させる方法

【請求項 2】

欠失、置換もしくは付加されるアミノ酸が活性中心近傍のアミノ酸である、項 1 に記載の方法

【請求項 3】

欠失、置換もしくは付加されるアミノ酸が活性中心から半径 10 オングストローム以内に存在するアミノ酸である、項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

野生型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素が、配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列からなる、項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法

【請求項 5】

配列番号 1 において、76 位、143 位、144 位、163 位、168 位、169 位、228 位、229 位、247 位、248 位、343 位、346 位、348 位、377 位、406 位、408 位、424 位からなる群より選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、項 4 に記載の方法

【請求項 6】

配列番号 1 において、168 位及び 169 位からなる群から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、項 4 に記載の方法

【請求項 7】

アミノ酸置換が、Q168A、(Q168A+L169G)、(Q168A+L169C)、(Q168A+L169P)、(Q168S+L169E)、(Q168S+L169P)、からなる群から選択される、項 6 に記載の方法

【請求項 8】

項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法により、野生型と比較して、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において比活性が向上した、改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素

【請求項 9】

項 8 に記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキット

【請求項 10】

項 8 に記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素を含むグルコースセンサー

【請求項 11】

項 8 に記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素を用いたグルコース測定法

【請求項 12】

項 8 に記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子。

【請求項 13】

項 12 に記載の遺伝子を含むベクター。

【請求項 14】

項 13 に記載のベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項 15】

項 14 に記載の形質転換体を培養することを特徴とする改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の製造法。

【書類名】明細書

【発明の名称】ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の比活性を向上する方法、および、比活性の向上したピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素

【技術分野】

【0001】

本発明は、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系における、野生型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の比活性を向上させる方法に関する。

また本発明は、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において、比活性が向上した改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素、その製造法、およびそれを用いたグルコースアッセイキットやグルコースセンサーに関する。

【0002】

本発明の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素は、臨床検査や食品分析などにおけるグルコースの定量に有用である。

【背景技術】

【0003】

ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素は、ピロロキノリンキノン（以下、PQQとも記載）を補酵素とするグルコース脱水素酵素である（以下、PQQ-GDHとも記載）。グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒するから、血糖の測定に用いることができる。血中グルコース濃度は、糖尿病の重要なマーカーとして臨床診断上きわめて重要な指標である。現在、血中グルコース濃度の測定は、グルコースオキシダーゼを使用したバイオセンサーを用いる方法が主流となっているが、反応が溶存酸素濃度に影響されるから、測定値に誤差が生じる可能性があった。このグルコースオキシダーゼにかわる新たな酵素としてピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素が注目されている。我々のグループは、アシネトバクター・バウマンニ（*Acinetobacter baumannii*）NCIMB11517株が、ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素を産生することを見出し、遺伝子のクローニングならびに高発現系を構築した（たとえば、特許文献1を参照）。

【特許文献1】特開平11-243949号公報

【0004】

ところで、ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素をバイオセンサーに用いる場合、そのストリップ上では、酵素は検体の血液により溶解されることになるが、血液は、水や他の一般的な試薬に用いられる溶媒と比較して、粘度が高く、溶解性が低いので、ストリップ上に添加する酵素量は、タンパク量として少ない方がより望ましい。そのため、単位タンパク質あたりの酵素活性、すなわち比活性、が向上したピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の取得が望まれていた。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は従来技術の課題を背景になされたもので、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において、ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の比活性を野生型と比較して向上させることを課題とするものである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

一般的な血糖モニターでは、フェリシアン化物イオンがメディエーターとして用いられている。本発明者らは、鋭意検討の結果、野生型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸を欠失、置換もしくは付加することにより、上記課題を達成することを見出した。

【0007】

すなわち、本発明は以下のような構成からなる。

項1.

野生型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸を欠失、置換もしくは付加することにより、野生型と比較して、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において、比活性を向上させる方法

項2.

欠失、置換もしくは付加されるアミノ酸が活性中心近傍のアミノ酸である、項1に記載の方法

項3.

欠失、置換もしくは付加されるアミノ酸が活性中心から半径10オングストローム以内に存在するアミノ酸である、項1に記載の方法。

項4.

野生型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素が、配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなる、項1～3のいずれか1項に記載の方法

項5.

配列番号1において、76位、143位、144位、163位、168位、169位、228位、229位、247位、248位、343位、346位、348位、377位、406位、408位、424位からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、項4に記載の方法

項6.

配列番号1において、168位及び169位からなる群から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、項4に記載の方法

項7.

アミノ酸置換が、Q168A、(Q168A+L169G)、(Q168A+L169C)、(Q168A+L169P)、(Q168S+L169E)、(Q168S+L169P)、からなる群から選択される、項6に記載の方法

項8.

項1～7のいずれか1項に記載の方法により、野生型と比較して、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において比活性が向上した改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素

項9.

項8に記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキット

項10.

項8に記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素を含むグルコースセンサー

項11.

項8に記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素を用いたグルコース測定法

項12.

項8に記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子。

項13.

項12に記載の遺伝子を含むベクター。

項14.

項13に記載のベクターで形質転換された形質転換体。

項15.

項14に記載の形質転換体を培養することを特徴とする改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の製造法。

【0008】

なお、これまでフェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において、比活

性が向上した改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素に関する報告はない。

【発明の効果】

【0009】

本発明による改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素は、比活性向上により、それを用いたグルコースアッセイキットやグルコースセンサーへの酵素添加量の減量を可能にし、安価な製造を可能にする。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明でいうピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素とは、ピロロキノリンキノンを補酵素として配位し、D-グルコースを酸化してD-グルコノ-1, 5-ラク톤を生成するという反応を触媒する酵素であり、由来や構造に関しては特に限定するものではない。例えば、アシネトバクター属由来のものなどが挙げられる。さらに具体的には、配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなるものが挙げられる。

【0011】

配列番号1において、アミノ酸の位置は、シグナル配列が除かれた後のN末端アミノ酸を1として番号付けするものであり、配列番号1においては、アスパラギン酸である。

【0012】

本発明における比活性とは、単位重量の酵素分子あたりの活性であり、より詳しくは精製酵素1mgあたりの酵素活性の単位である。

【0013】

本発明における活性中心とは、ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素において、基質であるD-グルコースが結合して触媒作用を受ける部位を言い、たとえば、D-グルコースが結合する基質結合部位及び／または酸化触媒反応が行われるピロロキノリンキノン結合部位からなる。

【0014】

さらに本発明における野生型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素とは、自然界に存在するピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素いっばんのことである。一方、改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素とは、野生型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素と比較して、そのアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸に欠失、置換、挿入が見られるもののことである。

【0015】

特に本発明で記載する改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素とは、野生型と比較して、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において比活性が向上した改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素のことである。

【0016】

本発明の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素としては、例えば、活性中心近傍のアミノ酸を少なくとも1つ他のアミノ酸に置換することにより、野生型と比較して、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において比活性が向上した改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素がある。

【0017】

本発明の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素として、さらに詳しくは活性中心から半径10オングストローム以内に存在するアミノ酸を、少なくとも1つ他のアミノ酸に置換したものであり、またそのアミノ酸が、76位、143位、144位、163位、168位、169位、228位、229位、247位、248位、343位、346位、348位、377位、406位、408位、424位からなる群より選ばれたアミノ酸からなるものである。

【0018】

また、本発明の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素として、配列番号1に記載される野生型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素が、アミノ

酸配列からなるものも含み、そのアミノ酸配列において、168位、169位の少なくとも1つの位置においてアミノ酸置換を有する改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素が例示される。

【0019】

本発明の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素をさらに詳細に例示するならば、Q168A、(Q168A+L169G)、(Q168A+L169C)、(Q168A+L169P)、(Q168S+L169E)、(Q168S+L169P)、からなる群から選択されるアミノ酸置換を有するピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素である。

【0020】

ここで、Q168Aとは、168位のQ (Gln) をA (Ala) に置換することを意味する。

【0021】

配列番号1で示される改変されるべき野生型PQQGDHタンパク質及び配列番号2で示されるその塩基配列は、公知であり、特開平11-243949号公報に記載されている。

【0022】

本発明の、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において、ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の比活性を、野生型より向上させる方法は、当該酵素のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸を欠失、置換もしくは付加することにより、達成されうる。

【0023】

本発明の方法において、欠失、置換もしくは付加されるアミノ酸は、特に限定されないが、活性中心近傍のアミノ酸であることが望ましい。あるいは、欠失、置換もしくは付加されるアミノ酸は、活性中心から半径10オングストローム以内に存在するアミノ酸であることが望ましい。

【0024】

また、本発明の方法において、ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素が、配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなるものであっても良い。

配列番号1において、76位、143位、144位、163位、168位、169位、228位、229位、247位、248位、343位、346位、348位、377位、406位、408位、424位からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることが望ましい。

また、配列番号1において、168位及び169位からなる群から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることが望ましい。

さらに、配列番号1において、アミノ酸置換が、Q168A、(Q168A+L169G)、(Q168A+L169C)、(Q168A+L169P)、(Q168S+L169E)、(Q168S+L169P)、からなる群から選択されることが望ましい。

【0025】

本発明は、上記の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子である。

【0026】

本発明の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の製造方法は、特に限定されないが、以下に示すような手順で製造することが可能である。タンパク質を構成するアミノ酸配列を改変する方法としては、通常行われる遺伝情報を改変する手法が用いられる。すなわち、タンパク質の遺伝情報を有するDNAの特定の塩基を変換することにより、或いは特定の塩基を挿入または欠失させることにより、改変蛋白質の遺伝情報を有するDNAが作成される。DNA中の塩基を変換する具体的な方法としては、例えば市販のキット (Transformer Mutagenesis Kit; Clontech 製, EXO III/Mung Bean Deletion Kit; Stratag

ene製, QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit; Stratagene製など)の使用、或いはポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)の利用が挙げられる。

【0027】

作製された改変タンパク質の遺伝情報を有するDNAは、プラスミドと連結された状態にて宿主微生物中に移入され、改変タンパク質を生産する形質転換体となる。この際のプラスミドとしては、例えば、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) を宿主微生物とする場合にはpBluescript, pUC18などが使用できる。宿主微生物としては、例えば、エシェリヒア・コリ W3110、エシェリヒア・コリ C600、エシェリヒア・コリ JM109、エシェリヒア・コリ DH5 α などが利用できる。宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシェリヒア属に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で組換えDNAの移入を行なう方法などを採用することができ、更にエレクトロポレーション法を用いても良い。更には、市販のコンピテントセル (例えば、コンピテントハイ JM109; 東洋紡績製) を用いても良い。

【0028】

こうして得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量の改変タンパク質を安定して生産し得る。形質転換体である宿主微生物の培養形態は宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、通常多くの場合は液体培養で行うが、工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。培地の栄養源としては微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、シュークロース、ラクトース、マルトース、フラクトース、糖蜜、ピルビン酸などが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。培養温度は菌が発育し、改変蛋白質を生産する範囲で適宜変更し得るが、エシェリヒア・コリの場合、好ましくは20~42℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、改変タンパク質が最高収量に達する時期を見計らって適当時期に培養を終了すればよく、通常は6~48時間程度である。培地pHは菌が発育し改変タンパク質を生産する範囲で適宜変更し得るが、特に好ましくはpH6.0~9.0程度である。

【0029】

培養物中の改変タンパク質を生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し利用することもできるが、一般には常法に従って改変タンパク質が培養液中に存在する場合は、濾過、遠心分離などにより、改変タンパク質含有溶液と微生物菌体とを分離した後に利用される。改変タンパク質が菌体内に存在する場合には、得られた培養物から濾過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いでこの菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的方法で破壊し、また必要に応じてEDTA等のキレート剤及びまたは界面活性剤を添加して改変タンパク質を可溶化し、水溶液として分離採取する。

【0030】

この様にして得られた改変タンパク質含有溶液を、例えば、減圧濃縮、膜濃縮、更に硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、或いは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈澱法により沈澱せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。吸着剤或いはゲル濾過剤などによるゲル濾過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーにより、精製された改変タンパク質を得ることができる。

【0031】

改変タンパク質は、液状(水溶液、懸濁液等)、粉末、凍結乾燥など種々の形態をとることができる。凍結乾燥法としては、特に制限されるものではなく常法に従って行えばよ

い。本発明の酵素を含む組成物は凍結乾燥物に限られず、凍結乾燥物を再溶解した溶液状態であってもよい。また、グルコース測定を行なう際には、グルコースアッセイキット、グルコースセンサーなどの種々の形態をとることができる。この様にして得られた精製された改変タンパク質は、以下のような方法により安定化することができる。

【0032】

塩化カルシウム、酢酸カルシウム、クエン酸カルシウムなどのカルシウム塩、或いはグルタミン酸、グルタミン、アスパラギン酸、リジンなどのアミノ酸、或いは α -ケトグルタル酸、 α -ケトグルコン酸、リンゴ酸などの有機酸、或いは血清アルブミンを単独で、または組み合わせて含有させることにより、改変タンパク質をさらに安定化することができる。

【0033】

あるいは、(1) アスパラギン酸、グルタミン酸、 α -ケトグルタル酸、リンゴ酸、 α -ケトグルコン酸、 α -サイクロデキストリンおよびそれらの塩からなる群から選ばれた1種または2種以上の化合物および(2) アルブミンを共存せしめることにより、改変タンパク質をさらに安定化することができる。

凍結乾燥組成物中においては、PQQGDH含有量は、酵素の起源によっても異なるが、通常は約5～50%（重量比）の範囲で好適に用いられる。酵素活性に換算すると、100～2000U/mgの範囲で好適に用いられる。

アスパラギン酸、グルタミン酸、 α -ケトグルタル酸、リンゴ酸、及び α -ケトグルコン酸の塩としては、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、及びマグネシウム等の塩が挙げられるが特に限定されるものではない。上記化合物とその塩及び α -サイクロデキストリンの添加量は、1～90%（重量比）の範囲で添加することが好ましい。これらの物質は単独で用いてもよいし、複数組み合わせてもよい。

含有される緩衝液としては特に限定されるものではないが、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、GOOD緩衝液などが挙げられる。該緩衝液のpHは5.0～9.0程度の範囲で使用目的に応じて調整される。凍結乾燥物中においては緩衝剤の含有量は、特に限定されるものではないが、好ましくは0.1%（重量比）以上、特に好ましくは0.1～30%（重量比）の範囲で使用される。

使用できるアルブミンとしては、牛血清アルブミン(BSA)、卵白アルブミン(OVA)などが挙げられる。特にBSAが好ましい。該アルブミンの含有量は、好ましくは1～80%（重量比）、より好ましくは5～70%（重量比）の範囲で使用される。

組成物には、さらに他の安定化剤などをPQQGDHの反応に特に悪い影響を及ぼさないような範囲で添加してもよい。本発明の安定化剤の配合法は特に制限されるものではない。例えばPQQGDHを含む緩衝液に安定化剤を配合する方法、安定化剤を含む緩衝液にPQQGDHを配合する方法、あるいはPQQGDHと安定化剤を緩衝液に同時に配合する方法などが挙げられる。

【0034】

また、改変タンパク質の安定化方法としては、カルシウムイオンと特定のアミノ酸を併用しても安定化効果が得られる。すなわち、(1) カルシウムイオンまたはカルシウム塩、および(2) グルタミン酸、グルタミンおよびリジンからなる群から選択されたアミノ酸を含有させることにより、本発明のPQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼを安定化させることができる。

カルシウム塩としては、塩化カルシウムまたは酢酸カルシウムもしくはクエン酸カルシウム等の無機酸または有機酸のカルシウム塩などが例示される。また、水性組成物において、カルシウムイオンの含有量は、 1×10^{-4} ～ 1×10^{-2} Mであることが好ましい。カルシウムイオンまたはカルシウム塩のみを含有させた場合、安定性にわずかな効果が見られるが、さらに下記アミノ酸を含有させることにより、安定性がさらに向上する。

グルタミン酸、グルタミンおよびリジンからなる群から選択されるアミノ酸は、1種または2種以上であってもよい。前記の水性組成物において、グルタミン酸、グルタミンおよびリジンからなる群から選択されたアミノ酸の含有量は、0.01～0.2重量%であ

ることが好ましい。

さらに血清アルブミンを含有させてもよい。前記の水性組成物に血清アルブミンを添加する場合、その含有量は0.05~0.5重量%であることが好ましい。

緩衝剤としては、通常のもので使用され、通常、組成物のpHを5~10とするものが好ましい。具体的にはトリス塩酸、ホウ酸、グッド緩衝液が用いられるが、カルシウムと不溶性の塩を形成しない緩衝液はすべて使用できる。

前記の水性組成物には、必要により他の成分、例えば界面活性剤、安定化剤、賦形剤などを添加しても良い。

【0035】

本発明においては以下の種々の方法によりグルコースを測定することができる。

グルコースアッセイキット

本発明はまた、本発明に従う改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキットを特徴とする。本発明のグルコースアッセイキットは、本発明に従うグルコース脱水素酵素を少なくとも1回のアッセイに十分な量で含む。典型的には、キットは、本発明のグルコース脱水素酵素に加えて、アッセイに必要な緩衝液、メディエーター、キャリブレーションカーブ作製のためのグルコース標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従うグルコース脱水素酵素は種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。好ましくは本発明の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素はホロ化した形態で提供されるが、アポ酵素の形態で提供し、使用時にホロ化することもできる。

【0036】

グルコースセンサー

本発明はまた、本発明に従う改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素を用いるグルコースセンサーを特徴とする。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセンあるいはその誘導体で代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせ用いてもよい。好ましくは本発明のグルコース脱水素酵素はホロ化した形態で電極上に固定化するが、アポ酵素の形態で固定化し、ピロロキノリンキノンを別の層としてまたは溶液中で提供することもできる。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明のグルコース脱水素酵素をカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドをブロッキングする。

【0037】

グルコース濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、PQQおよび配位金属、およびメディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明のグルコース脱水素酵素を固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）を用いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコース濃度を計算することができる。

【0038】

ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素をバイオセンサーに用いる場合、そのストリップ上では、酵素は検体の血液により溶解されることになるが、血液は、水や他の一般的な試薬に用いられる溶媒と比較して、粘度が高く、溶解性が低いので、ストリップ上に添加する酵素量は、タンパク量として少ない方がより望ましい。

本願発明の方法によれば、本願発明のピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の比活性は1より大きい酵素が得られる。好ましくは1.1以上、より好ましくは1.5以上のものが得られる。

比活性が高いと、タンパク質としての添加量が少なく済むため、本願発明のグルコースセンサーは、既述の安定化剤等の添加量の上限制約が低減され、より高い安定性を確保できる可能性を高められる。

【実施例】

【0039】

以下、配列番号1に記載されるピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素において、Q168A、(Q168A+L169G)、(Q168A+L169C)、(Q168A+L169P)、(Q168S+L169E)、(Q168S+L169P)の各改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素を用いて、本発明を具体的に説明する。言うまでもなく、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

なお、本実施例で使用したQ168A、(Q168A+L169G)、(Q168A+L169C)、(Q168A+L169P)、(Q168S+L169E)、(Q168S+L169P)各改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の精製酵素標品は、以下に記載の手順で取得した。

【0040】

PQQ依存性グルコース脱水素酵素遺伝子の発現プラスミドの構築

野生型PQQ依存性グルコース脱水素酵素の発現プラスミドpNPG5は、ベクターpBluescript SK(-)のマルチクローニング部位にアシネトバクター・バウマンニ(Acinetobacter baumannii) NCIMB11517株由来のPQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする構造遺伝子を挿入したものである。その塩基配列を配列表の配列番号2に、また該塩基配列から推定されるPQQ依存性グルコース脱水素酵素のアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。

【0041】

変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素の作製

野生型PQQ依存性グルコース脱水素酵素遺伝子を含む組換えプラスミドpNPG5と配列番号3記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE製)を用いて、そのプロトコールに従って変異処理操作を行い、更に塩基配列を決定して、配列番号2記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがアラニンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M168A)を取得した。

pNPG5と配列番号4記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがアラニンに、169番目のロイシンがグリシンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M168A+169G)を取得した。

pNPG5と配列番号5記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがアラニンに、169番目のロイシンがシステインに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M168A+169C)を取得した。

pNPG5と配列番号6記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがアラニンに、169番目のロイシンがプロリンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M168A+169P)を取得した。

pNPG5と配列番号7記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがセリンに、169番目のロイシンがグルタミン酸に置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M168S+1

69E)を取得した。

pNPG5と配列番号8記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがセリンに、169番目のロイシンがプロリンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M168S+169P)を取得した。

pNPG5M168A、pNPG5M168A+169G、pNPG5M168A+169C、pNPG5M168A+169P、pNPG5M168S+169E、pNPG5M168S+169Pの各組換えプラスミドで大腸菌コンピテントセル(エシェリヒア・コリ-JM109;東洋紡績製)を形質転換し、該形質転換体をそれぞれ取得した。

【0042】

シュードモナス属細菌で複製できる発現ベクターの構築

組換えプラスミドpNPG5M168AのDNA5 μ gを制限酵素BamHIおよびXhoI(東洋紡績製)で切断して、変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素の構造遺伝子部分を単離した。単離したDNAとBamHIおよびXhoIで切断したpTM33(1 μ g)とをT4DNAリガーゼ1単位で16 $^{\circ}$ C、16時間反応させ、DNAを連結した。連結したDNAはエシェリヒア・コリDH5 α のコンピテントセルを用いて形質転換を行った。得られた発現プラスミドをpNPG6M168Aと命名した。

pNPG5M168A+169G、pNPG5M168A+169C、pNPG5M168A+169P、pNPG5M168S+169E、pNPG5M168S+169Pの各組換えプラスミドについても上記方法と同様にして発現プラスミドを取得した。得られた発現プラスミドそれぞれpNPG6M168A+169G、pNPG6M168A+169C、pNPG6M168A+169P、pNPG6M168S+169E、pNPG6M168S+169Pと命名した。

【0043】

シュードモナス属細菌の形質転換体の作製

シュードモナス・プチダTE3493(微工研寄12298号)をLBG培地(LB培地+0.3%グリセロール)で30 $^{\circ}$ C、16時間培養し、遠心分離(12,000rpm、10分間)により菌体を回収し、この菌体に氷冷した300mMシュクロースを含む5mMK-リン酸緩衝液(pH7.0)8mlを加え、菌体を懸濁した。再度遠心分離(12,000rpm、10分間)により菌体を回収し、この菌体に氷冷した300mMシュクロースを含む5mMK-リン酸緩衝液(pH7.0)0.4mlを加え、菌体を懸濁した。

該懸濁液に発現プラスミドpNPG6M168Aを0.5 μ g加え、エレクトロポレーション法により形質転換した。100 μ g/mlのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に生育したコロニーより、目的とする形質転換体を得た。

pNPG6M168A+169G、pNPG6M168A+169C、pNPG6M168A+169P、pNPG6M168S+169E、pNPG6M168S+169Pについても、それぞれ同様に実施し、目的とする形質転換体を得た。

【0044】

ホロ型発現精製酵素の調製方法

500mlのTerrific brothを2L容坂口フラスコに分注し、121 $^{\circ}$ C、20分間オートクレーブを行い、放冷後別途無菌濾過したストレプトマイシンを100 μ g/mlになるように添加した。この培地に100 μ g/mlのストレプトマイシンを含むPY培地で予め30 $^{\circ}$ C、24時間培養したシュードモナス・プチダTE3493(pNPG6M168A)の培養液を5ml接種し、30 $^{\circ}$ Cで40時間通気攪拌培養した。菌体を遠心分離により集菌し、20mMリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁した後、超音波処理により破碎し、更に遠心分離を行い、上清液を粗酵素液として得た。得られた粗酵素液をHiTrap-p-SP(アマシャム-ファルマシア)イオン交換カラムクロマトグラフィーにより分離・精製した。次いで10mM PIPES-NaOH緩衝液(pH6.5)で透析した後、終濃度が1mMになるように塩化カルシウムを添加した。最後にHiTrap-DEA

E (アマシャム-ファルマシア) イオン交換カラムクロマトグラフィーにより分離・精製し、精製酵素標品を得た。本方法により得られた標品は、SDS-PAGE 的にほぼ単一なバンドを示した。

pNPG6M168A+169G、pNPG6M168A+169C、pNPG6M168A+169P、pNPG6M168S+169E、pNPG6M168S+169P によるシュードモナス・プチダTE3493 形質転換体についても上記方法と同様にして精製酵素標品を取得した。

このようにして取得した精製酵素を用いて性能を評価した。

【0045】

フェリシアン化物イオンをメディエーターとするピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素活性の測定方法

・ 測定原理

D-グルコース + フェリシアン化物イオン + PQQGDH →

D-グルコノ-1, 5-ラクトン + フェロシアン化物イオン

フェリシアン化物イオンの還元により生じたフェロシアン化物イオンの存在は、分光光度法により波長 420 nm での吸光度の減少を測定することで確認した。

・ 単位の定義

1 単位は、以下に記載の条件下で 1 分当たり 1 ミリモルの D-グルコースを酸化させるピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の酵素量をいう。

(3) 方法

試薬

A. D-グルコース溶液: 1 M (1.8 g D-グルコース (分子量 180.16) / 10 ml H₂O)

B. PIPES-NaOH 緩衝液, pH 6.5: 50 mM (60 mL の水中に懸濁した 1.51 g の PIPES (分子量 302.36) を、5 N NaOH に溶解し、2.2 mL の 10% Triton X-100 を加える。5 N NaOH を用いて 25℃ で pH を 6.5 ± 0.05 に調整し、水を加えて 100 mL とした。)

C. フェリシアン化カリウム溶液: 50 mM (0.165 g フェリシアン化カリウム (分子量 329.25) / 10 ml H₂O)

D. 蒸留水

E. 酵素希釈液: 1 mM CaCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.1% BSA を含む 50 mM PIPES-NaOH 緩衝液 (pH 6.5)

手順

1. 遮光ビンに以下の反応混合物を調製し、氷上で貯蔵した (用事調製)

0.9 ml D-グルコース溶液

(A)

25.5 ml PIPES-NaOH 緩衝液 (pH 6.5)

(B)

2.0 ml フェリシアン化カリウム溶液

(C)

1.0 ml 蒸留水

(D)

反応混合物中の濃度を表 1 に示す。

【0046】

【表 1】

反応混合物中の濃度		
PIPES 緩衝液	42	mM
D-グルコース	30	mM
フェリシアン化カリウム	3.4	mM

【0047】

2. 3.0 ml の反応混合液を試験管（プラスチック製）に入れ、37℃で5分間予備加温した。

3. 0.1 ml の酵素溶液を加え、穏やかに混合した。

4. 420 nm での水に対する吸光度の減少を 37℃に維持しながら分光光度計で 4～5 分間記録し、曲線の初期直線部分からの 1 分間当たりの ΔOD を計算した（OD テスト）

同時に、酵素溶液に代えて酵素希釈液（E）加えることを除いては同一の方法を繰り返す、ブランク（ ΔOD ブランク）を測定した。

酵素溶液は、アッセイの直前に氷冷した酵素希釈液（E）で 1.0 U/ml 程度に希釈した（該酵素の接着性のためにプラスチックチューブの使用が好ましい）

【0048】

計算

活性を以下の式を用いて計算する：

体積活性 (U/ml) = $\{\Delta OD / \min (\Delta OD \text{ テスト} - \Delta OD \text{ ブランク}) \times V_t \times df\} / (1.04 \times 1.0 \times V_s)$

重量活性 (U/mg) = (U/ml) $\times 1 / C$

V_t : 総体積 (3.1 ml)

V_s : サンプル体積 (0.1 ml)

1.04 : フェリシアン化カリウムのミリモル分子吸光係数

1.0 : 光路長 (cm)

df : 希釈係数

C : 溶液中の酵素濃度 (c mg/ml)

【0049】

比活性の測定

単位液量あたりのタンパク含量を Bradford 法を原理とするプロテインアッセイにより測定した。実際には Biorad 社製のプロテインアッセイキットを用い、そのプロトコルに従った。5 倍希釈した市販の染色液 5 ml に 0.1 ml の酵素溶液を添加し、混和後、室温にて 30 分放置した後、595 nm の波長にて吸光度を測定した。この際、濃度既知のウシ血清アルブミンを同様に測定することで検量線を作成し、それより各酵素溶液の単位液量あたりのタンパク含量を測定した。

一方、上記活性測定法により単位液量あたりの活性値を測定し、単位液量あたりの活性値を単位液量あたりのタンパク含量で割ることで、ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の比活性を求めた。

結果を表 2 に示す。

【0050】

【表 2】

変異	比活性(U/mg)
野生型	1.0
Q168A	8.6
Q168A+L169G	2.5
Q168A+L169C	1.9
Q168A+L169P	20.1
Q168S+L169E	1.1
Q168S+L169P	13.1

【0051】

比活性測定の結果、フェリシアン化物イオンをメディエーターとして酵素活性を測定した場合、いずれの改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素においても、野生型と比較して、比活性の増大を確認することが出来た。

【0052】

野生型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸を欠失、置換もしくは付加することにより、比活性が増大する理由としては、次のような推論が可能である。

【0053】

ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の詳細な反応メカニズムは、基質であるD-グルコースが酸化されて、電子が酵素に配位しているピロロキノリンキノンに伝達し、さらにメディエーターであるフェリシアン化物イオンに伝達するというものである。そして、酵素反応の律速となるポイントは、ピロロキノリンキノンからフェリシアン化物イオンへの反応性が低いことから、メディエーターであるフェリシアン化物イオンに電子が伝達される過程にあると考えられる。

【0054】

例えば、活性中心近傍のアミノ酸を変異した場合を考えると、活性中心を含む活性中心近傍の酵素の立体構造が変化し、フェリシアン化物イオンが進入しやすくなるため、酵素反応の律速となっていたフェリシアン化物イオンへの電子伝達がスムーズになり、その結果、比活性が向上したと考えられる。

【0055】

すなわち、活性中心近傍のアミノ酸を1つあるいはそれ以上置換変異させることにより、同様にフェリシアン化物イオンをメディエーターとする酵素活性測定において比活性の向上が望めると推察する。あるいは別の見方では、本発明において、変異は活性中心から半径10オングストローム以内に存在するアミノ酸に対して行なわれることが望ましい。

活性中心近傍のアミノ酸としては、76位、143位、144位、163位、168位、169位、228位、229位、247位、248位、343位、346位、348位、377位、406位、408位、424位に位置するアミノ酸が具体的に挙げられる（たとえば、非特許文献1を参照）。

【非特許文献1】Protein Science (2000), 9:1265-1273

【産業上の利用可能性】

【0056】

本発明の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素は、比活性向上により、測定系への酵素添加量の減量を可能にすることから、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする、グルコースアッセイキットやグルコースセンサーの安価な製造を可能

にする。臨床検査や食品分析など幅広い用途分野に利用することが出来、産業界に寄与することが大である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Toyo Boseki Kabushiki Kaisya

<120> ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の比活性を向上する方法、
および、比活性の向上したピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素

<130> 03-0612

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 455

<212> PRT

<213> Acinetobacter baumannii NCIB11517

<400> 1

Asp Ile Pro Leu Thr Pro Ala Gln Phe Ala Lys Ala Lys Thr Glu Asn
 1 5 10 15

Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu
 20 25 30

Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly
 35 40 45

Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro Val Ser Gly Ser Ala Lys Thr Val Phe
 50 55 60

Gln Val Pro Glu Ile Val Ser Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu
 65 70 75 80

Gly Phe Ala Phe His Pro Asp Phe Lys His Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile
 85 90 95

Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn
 100 105 110

Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr Thr Tyr Asn Lys Thr Thr Asp Thr Phe

115

120

125

Glu Lys Pro Ile Asp Leu Ile Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His
 130 135 140

Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr
 145 150 155 160

Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn
 165 170 175

Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln Gln Glu Leu Asn Ser Lys Asp Tyr
 180 185 190

His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Val
 195 200 205

Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr
 210 215 220

Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly Leu Ala Phe Ala Pro Asn Gly Lys
 225 230 235 240

Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu
 245 250 255

Val Leu Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys
 260 265 270

Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Thr Asn Lys
 275 280 285

Ser Gln Ile Lys Asp Leu Ala Gln Asn Gly Ile Lys Val Ala Thr Gly
 290 295 300

Val Pro Val Thr Lys Glu Ser Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro
 305 310 315 320

Pro Leu Lys Thr Leu Tyr Thr Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp
 325 330 335

Pro Thr Cys Gly Glu Met Ala Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro
 340 345 350

Ser Ser Ala Tyr Val Tyr Thr Gly Gly Lys Lys Ala Ile Pro Gly Trp
 355 360 365

Glu Asn Thr Leu Leu Val Pro Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg
 370 375 380

Ile Lys Leu Asp Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Leu Asp Asp Ala Ile Pro
 385 390 395 400

Met Phe Lys Ser Asn Asn Arg Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Glu
 405 410 415

Gly Asn Thr Leu Tyr Val Leu Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys
 420 425 430

Asp Asp Gly Ser Val Thr His Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile
 435 440 445

Lys Phe Thr Tyr Asn Gly Lys
 450 455

<210> 2
 <211> 1368
 <212> DNA
 <213> Acinetobacter baumannii NCIB11517

<400> 2
 gatatacctc tgacacctgc tcagttcgca aaagcgaaaa cagaaaattt tgataaaaaa 60
 gtgattctgt ccaatttaaa taaaccacat gctttgttat gggggccaga taatcaaatt 120
 tggttaaccg aacgtgcaac tggcaaaatt ttaagagtaa atcctgtatc tggtagcgcg 180
 aaaacagtat ttcaggttcc tgaaattgtg agtgatgctg atgggcaaaa tggtttgtta 240

ggttttgctt ttcatcctga cttaaacaat aacccttata tctatatattc aggcactttt 300
aaaaatccaa aatctacaga taaagagtta cctaatacaga cgattattcg tagatatacc 360
tataataaaa ctacagatac atttgaaaag cctattgatt tgattgcagg tttaccgtca 420
tcaaaagatc atcagtctgg tcgtctcgtt attgggtccag accaaaaaat ctactatacg 480
attgggtgacc aaggctgtaa tcagttagct tatctgttct taccgaatca ggcacagcat 540
actccgactc agcaagagct caatagtaaa gactaccata catatatggg taaagtatta 600
cgcttaaate tggacggcag tgtacctaaa gacaaccaa gctttaacgg cgtagtgagt 660
catatctaca ctttagggca ccgtaatcca caaggtttag catttgcccc aaatggaaag 720
cttttacaat ctgagcaagg accaaattct gatgatgaaa ttaaccttgt attaaaagg 780
ggtaactatg gctggccaaa ttagcttggg tataaagatg acagtgggta tgcctatgca 840
aactattcgg cagcaaccaa taaatcacia attaaagatt tagctcaaaa cgggataaaa 900
gtagcaacag gtgttcctgt gactaaagag tctgaatgga ctggtaaaaa ctttgtgccg 960
cctttgaaaa ctttatatac ggtacaagat acctataact ataatgacc tacttgttgt 1020
gagatggcat atatttgctg gccaacgggt gcaccgtcat cagcatatgt atatacggga 1080
ggcaaaaaag cgattccagg gtgggaaaat acattattgg tcccatcttt aaaacgtggg 1140
gtgattttcc gtattaaatt ggacccgaca tatagcacga ctttgatga tgctatccca 1200
atgtttaaaa gcaataaccg ttatcgtgat gtcacgcta gtccagaagg taatacctta 1260
tatgtgctga ctgatacagc ggggaatgta caaaaagatg atggttctgt cactcatact 1320
ttagagaatc ccggttctct cattaaattt acatataacg gtaagtaa 1368

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> synthetic DNA

<400> 3

gaccaaggct gtaatgcgtt agcttatctg ttcttaccg

39

<210> 4

<211> 39
<212> DNA
<213> synthetic DNA

<400> 4
gaccaaggtc gtaatgcggg agcttatctg ttcttaccg 39

<210> 5
<211> 39
<212> DNA
<213> synthetic DNA

<400> 5
gaccaaggtc gtaatgcgtg tgcttatctg ttcttaccg 39

<210> 6
<211> 39
<212> DNA
<213> synthetic DNA

<400> 6
gaccaaggtc gtaatgcgcc agcttatctg ttcttaccg 39

<210> 7
<211> 39
<212> DNA
<213> synthetic DNA

<400> 7
gaccaaggtc gtaattcgga agcttatctg ttcttaccg 39

<210> 8
<211> 39
<212> DNA
<213> synthetic DNA

<400> 8
gaccaaggtc gtaattcgcc agcttatctg ttcttaccg 39

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の比活性を向上させること。

【解決手段】 野生型と比較して、フェリシアン化物イオンをメディエーターとする測定系において比活性が向上した改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素を提供する。

認定 - 付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 3 1 5 7 9 9
受付番号	5 0 3 0 1 4 8 6 6 6 6
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 5 年 9 月 9 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成15年 9月 8日

特願 2003-315799

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000003160]

1. 変更年月日

1990年 8月10日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

氏 名

東洋紡績株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.